

---

---

А.В. ГИДРАНОВИЧ

**МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЛИЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ  
БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

УО «Витебский государственный медицинский университет».

Республика Беларусь

Изучена активность глюкозофосфатизомеразы, фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазы и лактатдегидрогеназы в сыворотке крови больных раком молочной железы и здоровых женщин доноров 40 – 55 лет. Установлено повышение активности глюкозофосфатизомеразы в сыворотке крови больных раком молочной железы по сравнению со здоровыми донорами. Наибольшая активность глюкозофосфатизомеразы наблюдалась у больных 4-ой стадией заболевания. Активность фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазы имела тенденцию к увеличению у больных операбельным раком молочной железы 1 – 3-ей стадии. Активность лактатдегидрогеназы у больных раком молочной железы превышала активность таковой у здоровых доноров. Уменьшение соотношения активности лактатдегидрогеназы и глюкозофосфатизомеразы при увеличении стадии заболевания может свидетельствовать о большей экспрессии глюкозофосфатизомеразы в опухолевых клетках и, возможно, связано с агрессивным фенотипом опухоли.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, гликолиз, глюкозофосфатизомераза, фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозаза, лактатдегидрогеназа.

We studied the activity of glucosephosphate isomerase, fructose-1, 6-bisphosphate aldolase and lactate dehydrogenase in serum of breast cancer patients and healthy female donors at the age of 40–55. The rise of activity of glucosephosphate isomerase was observed in breast cancer patients in comparison with healthy donors. The highest activity of glucosephosphate isomerase was observed in patients with the 4<sup>th</sup> stage of breast cancer. Activity of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase had the tendency to rise in the patients with operable breast cancer of the 1<sup>st</sup> – 3<sup>rd</sup> stages. Activity of lactate dehydrogenase was higher in breast cancer patients when compared with healthy donors. The decrease of ratio of lactate dehydrogenase to glucosephosphate isomerase may be due to increased expression of glucosephosphate isomerase in malignant cells that may testify to aggressive tumor phenotype.

*Keywords:* breast cancer, glycolysis, glucosephosphate isomerase, fructose-1, 6-bisphosphate aldolase, lactate dehydrogenase.

Превращение глюкозы в лактат в присутствии кислорода известно как аэробный гликолиз. Активация аэробного гликолиза характерна для злокачественных раковых клеток. Этот феномен впервые описан О.Н. Warburg в 1920 году [1], что привело его к гипотезе о том, что рак возникает вви-

ду нарушения метаболизма в митохондриях. Несмотря на то что гипотеза О.Н. Warburg не была подтверждена в полной мере, экспериментальные исследования неоднократно подтверждали усиление гликолиза в опухолевых клетках в присутствии кислорода [2]. Использование технологии позит-

рон эмиссионной томографии позволило показать, что большинство первичных и метастатических опухолей имеет повышенный захват глюкозы [3]. Активный захват глюкозы обуславливается высоким уровнем гликолиза, повышением метаболической активности переносчиков глюкозы (GLUT1 и GLUT3) и гексокиназ I и II [4].

Неинвазивные клетки рака молочной железы MCF-7 имеют значительно более низкий уровень аэробного гликолиза, чем высокоинвазивные клетки линии MDA-mb-231. Эти наблюдения показывают, что измененный метаболизм глюкозы в опухолевых клетках является важным патофизиологическим феноменом, а не только адаптационным механизмом к гипоксии. Активация гликолиза дает злокачественным клеткам значительный пролиферативный потенциал. Повышенная активность захвата глюкозы опухолью, а соответственно активизация аэробного гликолиза связаны с неблагоприятным прогнозом [5].

Гликолиз является главным метаболическим путем злокачественной клетки. Он обеспечивает не только энергетические потребности быстро делящейся клетки, но

также является поставщиком веществ для анаболических процессов, роста и размножения клеток (рис. 1). Гликолитические процессы являются жизненно необходимыми для существования злокачественной клетки. Этот энергетически невыгодный путь обеспечивает получение всего 2 молекул АТФ вместо 36-38 молекул АТФ при окислительном фосфорилировании, однако, ввиду того что опухоль быстро растет, а процессы неоваскуляризации не успевают обеспечивать ее достаточным уровнем кислорода, злокачественные клетки находятся в хроническом гипоксическом состоянии, и только гликолиз поддерживает их жизнедеятельность.

Регуляция гликолиза у опухолевых клеток имеет некоторые особенности, которые позволяют поддерживать высокий уровень гликолиза в различных условиях. О. Варбург в 1862 году обнаружил, что в аэробных условиях опухолевые клетки превращают больше глюкозы в молочную кислоту, чем нормальные. В 1929 году Г. Крэбтри показал, что глюкоза уменьшает потребление кислорода интенсивно дышащими раковыми клетками. В 1861 году Пастер устано-

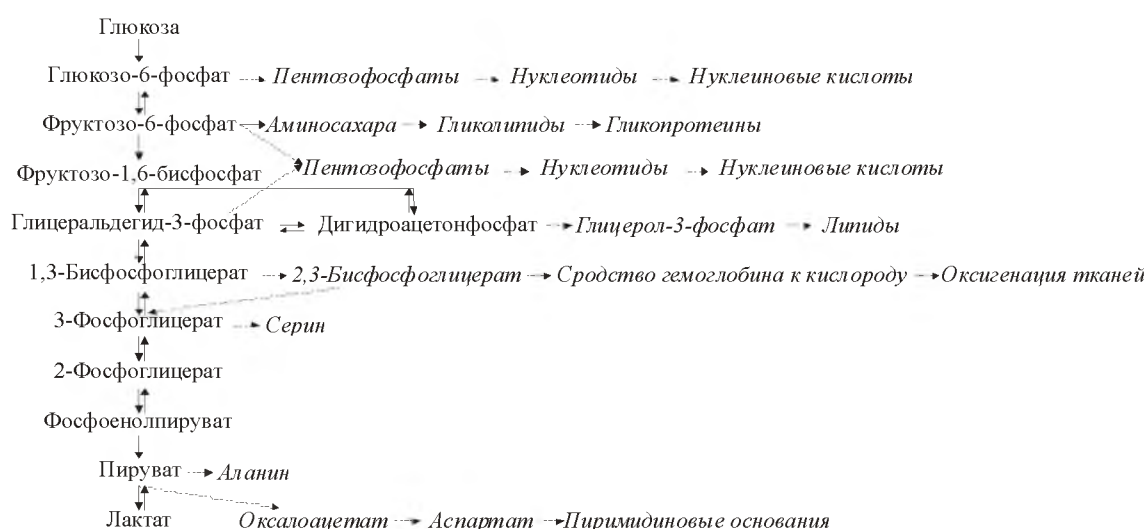


Рис.1. Анаболическая и регуляторная роль гликолиза.

вил, что клетки дрожжей в аэробных условиях потребляют меньше глюкозы, чем в анаэробных, т.е. торможение гликолиза дыханием. Эффект Пастера можно представить как результат последовательных ступенчатых процессов, происходящих во время окислительного фосфорилирования:

1) истощение неорганического фосфата и ADP, необходимых для гликолиза и повышение уровня АТФ,

2) инактивация фосфофруктокиназы посредством АТФ, что проявляется в накоплении глюкозо-6-фосфата,

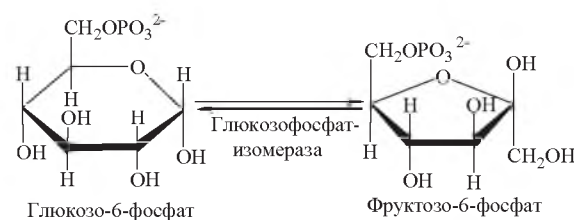
3) инактивация гексокиназы глюкозо-6-фосфатом.

Для злокачественных клеток характерно отсутствие торможения гликолиза дыханием (эффекта Пастера), что связано со значительным изменением системы регуляции процессов гликолиза, но наличие эффекта Варбурга и Крэбтри [6].

Система регуляции гликолиза осуществляется через путь фактора, индуцируемого гипоксией –  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ). В условиях нормоксии HIF- $1\alpha$  быстро утилизируется убиквитин-протеосомной системой. В условиях гипоксии наблюдается транслокация HIF- $1\alpha$  в ядро и связывание с промоторными участками генов (элементами ответа на гипоксию, HRE) и их транскрипционная активация. Гены, кодирующие ферменты гликолиза, имеют HRE и регулируются системой HIF- $1\alpha$ /HRE. Повышение активности гликолитических процессов необходимо злокачественным клеткам для обеспечения пластических и энергетических потребностей в условиях быстрого деления и недостатка кислорода. Клетки с более высоким уровнем аэробного гликолиза обладают более агрессивным фенотипом, высоким инвазивным и метастатическим потенциалом.

**Глюкозофосфатизомераза** катализирует обратимую реакцию изомеризации шестичленного пиранозного цикла глюко-

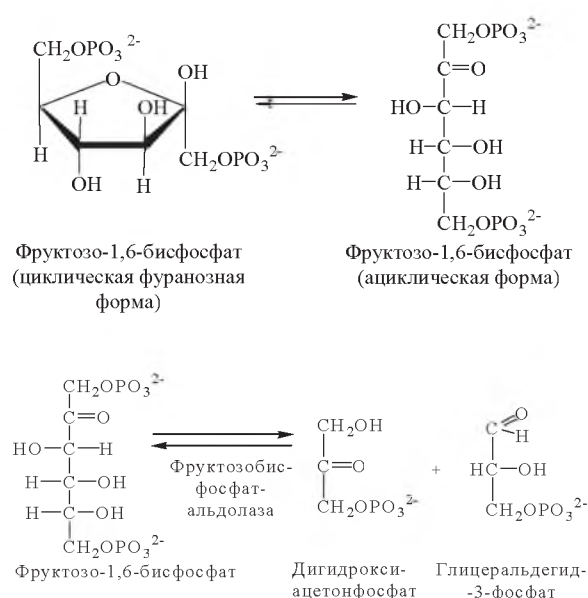
зо-6-фосфата в пятичленный фуранозный цикл фруктозо-6-фосфата, которая протекает в две ступени с разрывом полуацетальной структуры и образованием ендиола и напоминает катализируемую щелочью изомеризацию во фруктозу и маннозу.



Глюкозофосфатизомераза представляет собой один из наиболее активных и широко распространенных ферментов в различных органах и тканях. Динамическое равновесие реакции устанавливается очень быстро при содержании в реакционной среде примерно 70% Г-6-Ф и 30% Ф-6-Ф.

У людей недостаточность глюкозофосфатизомеразы вызывает хроническую гемолитическую анемию с повторяющимися гемолитическими кризами. Дефектный фермент имеет повышенное сродство к глюкозо-6-фосфату.

**Фруктозобисфосфат-альдолаза** катализирует ретроальдольное расщепление фруктозо-1,6-бисфосфата с образованием дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата. Фермент связывается с фруктозо-1,6-бисфосфатом в форме кетозы с незамкнутой цепью, т.е. происходит его дециклизация. Фуранозное кольцо  $\alpha$ -аномера спонтанно открывается и закрывается 8 раз в секунду, в то время как цикл  $\beta$ -аномера открывается и закрывается 35 раз в секунду. В стационарном состоянии содержится 81%  $\beta$ -формы, 15%  $\alpha$ -формы, 1,5% *гем*-диола и 2% кетона, но количество последнего достаточно для поддержания максимальной скорости ферментативного процесса.



Реакция протекает с разрывом  $C_3-C_4$  связи и определяет дальнейшее течение гликолиза. Равновесие реакции сильно смещено в сторону образования фруктозо-1,6-бисфосфата, но дальнейшее окисление глицеральдегид-3-фосфата под воздействием глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы сдвигает реакция в сторону образования триозофосфатов.

Отсутствие или дефицит кислорода в анаэробных условиях не позволяет происходить окислению NADH в дыхательной цепи транспорта электронов, образовавшегося в глицеральдегиддегидрогеназной реакции. NAD<sup>+</sup> является необходимым компонентом для дальнейшего окисления глицеральдегид-3-фосфата в анаэробных условиях. Окисление NADH обеспечивает **лактатдегидрогеназа**. Реакция протекает по уравнению:



Установлено, что активность альдолазы и глюкозофосфатизомеразы может значительно увеличиваться у крыс с привитой саркомой 256 Walker, однако данное повышение проявляется при достаточно большой массе опухоли.

Рак молочной железы занимает одно из первых мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности женского населения. До настоящего времени не выполнено окончательное исследование обмена углеводов клеток рака молочной железы и связь его с особенностями течения заболевания.

Целью данного исследования было изучить метаболическую активность гликолиза в сыворотке крови больных раком молочной железы с различной распространенностью заболевания.

## Материалы и методы

В проспективном исследовании обследованы 90 больных раком молочной железы, проходивших лечение в Витебском областном онкологическом диспансере в 2006-2007 гг. и 16 здоровых доноров. Критерием включения в исследование явилось наличие цитологически или гистологически верифицированного рака молочной железы, отсутствие поражения печени метастатическим либо неспецифическим процессом по данным УЗИ, нормальные показатели билирубина, АлАТ, АсАТ при биохимическом исследовании сыворотки крови. В плане исследования выделяли следующие группы больных по стадиям согласно приказу №80 от 9 февраля 2007 г. об утверждении клинических протоколов «Алгоритмы диагностики и лечения больных злокачественными новообразованиями»:

- 1) больные с 1-ой стадией рака молочной железы ( $T_1N_0M_0$ );
- 2) больные со 2-ой стадией рака молочной



ной железы ( $T_0N_1M_0$ ,  $T_1N_1M_0$ ,  $T_2N_0M_0$ ,  $T_2N_1M_0$ ,  $T_3N_0M_0$ );

3) больные с 3-ей стадией рака молочной железы ( $T_0N_2M_0$ ,  $T_1N_2M_0$ ,  $T_2N_2M_0$ ,  $T_0N_1M_0$ ,  $T_3N_1M_0$ ,  $T_3N_2M_0$ ,  $T_4N_0M_0$ ,  $T_4N_1M_0$ ,  $T_4N_2M_0$ ,  $T_{\text{любая}}N_3M_0$ );

4) больные с 4-ой стадией рака молочной железы ( $T_{\text{любая}}N_{\text{любая}}M_1$ ).

Венозную кровь получали при венепункции натошак и переносили в сухую пробирку. После ретракции сгустка проводили центрифугирование при 1500 об/мин в течение 15 мин. Полученную сыворотку, не имеющую признаков гемолиза, делили на аликвоты и замораживали в низкотемпературной холодильной установке при  $-16-18^\circ\text{C}$ , где хранили до исследования. О метаболической активности гликолиза судили по изменению каталитической активности ферментов: лактатдегидрогеназы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы, глюкозофосфатизомеразы. Активность лактатдегидрогеназы определяли в сыворотке крови по методу Howell [7] и выражали в  $\text{нмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$ . Активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы определяли по Bruns. Активность в сыворотке крови глюкозофосфатизомеразы определяли по методу Bruns и Hinsberg [8]. Полученные данные обрабатывали статистически. Рассчитывали медиану (М), среднее квадратическое отклонение ( $\sigma$ ), верхний и нижний квартили. При оценке достоверности изменений исходили из гипотезы о негауссовом распределении учетного признака в изучаемых группах. Для оценки значимости изменений между группами использовали критерий Манна–Уитни, Краскелла–Уоллеса. Изменения считали достоверными при  $p < 0,05$ .

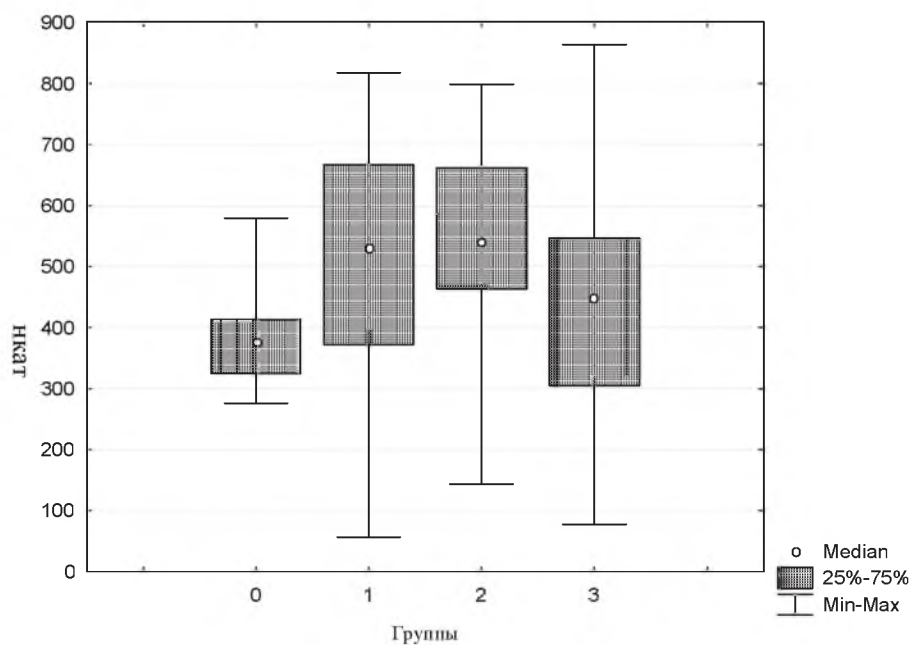
### Результаты и обсуждение

Установлено, что активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови больных раком молочной железы ( $n=90$ ) составила

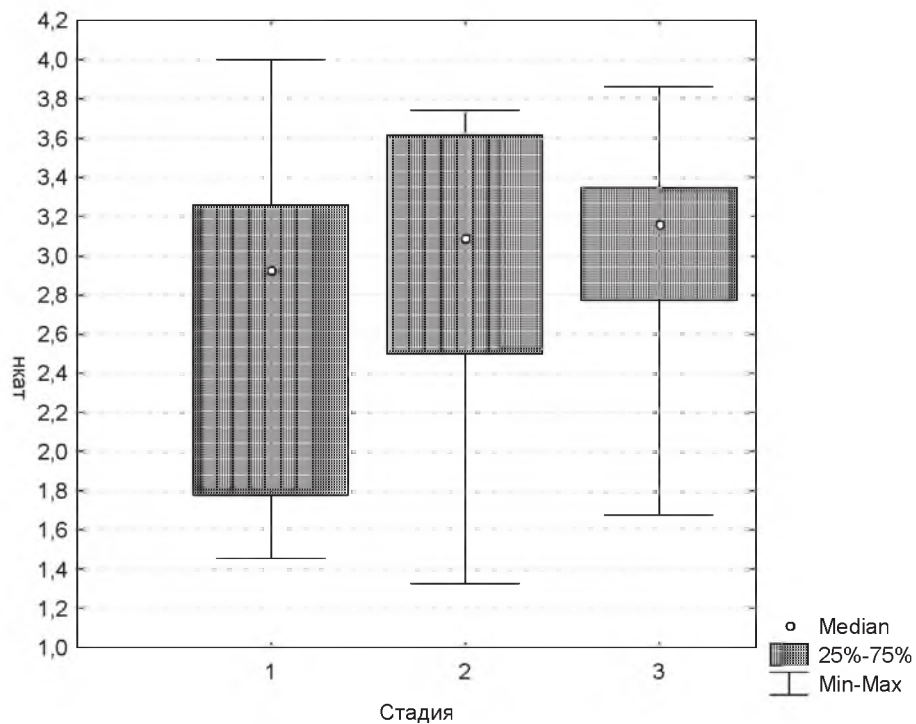
$485,77 \text{ нмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=193,95$ ) и была выше, чем у здоровых доноров  $384,75 \text{ нмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=87,22$ ,  $n=16$ ), тест Манна–Уитни  $p=0,0134$ . У больных 1 стадией рака молочной железы активность лактатдегидрогеназы была  $504,93 \text{ нмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=192,64$ ), что достоверно выше (тест Манна–Уитни  $p=0,0125$ ), чем у доноров. Подобная картина наблюдалась и при 2-ой стадии рака молочной железы, где активность лактатдегидрогеназы составляла  $514,83 \text{ нмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=181,62$ ), что достоверно выше, чем у доноров (тест Манна–Уитни  $p=0,00549$ ). При 3-ей стадии рака молочной железы активность лактатдегидрогеназы была выше, чем у доноров на 15,15% и составила  $443,09 \text{ нмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  (тест Манна–Уитни  $p=0,25$ ) (рис. 2).

Активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы в группе больных раком молочной железы 1-ой стадии ( $n=27$ ) составила  $2,57 \text{ мкмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=0,84$ ), в группе больных раком молочной железы 2-ой стадии ( $n=15$ ) этот показатель был равен  $2,94 \text{ мкмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=0,71$ ), в группе больных раком молочной железы 3-ей стадии ( $n=20$ ) активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы составила  $3,02 \text{ мкмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=0,57$ ) (рис. 3).

Медиана активности глюкозофосфатизомеразы в сыворотке крови доноров ( $n=16$ ) составила  $123,72 \text{ нмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=18,66$ ). У больных с 1-ой стадией рака молочной железы ( $n=34$ ) активность глюкозофосфатизомеразы была повышена в 1,64 раза по сравнению с аналогичным показателем у доноров и составила  $202,58 \text{ нмоль}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $\sigma=61,31$ ), изменения достоверны, Тест Манна–Уитни  $p=0,000015$ . Отмечалась тенденция к увеличению активности ГФИ в сыворотке крови больных раком молочной железы параллельно с увеличением стадии заболевания. В группе больных 2-ой стадией РМЖ ( $n=30$ ) активность глюкозофосфатизомеразы была выше и составила



**Рис. 2.** Активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови больных раком молочной железы 1-ой – 3-ей стадий и здоровых доноров.



**Рис. 3.** Активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы в сыворотке крови больных раком молочной железы 1-ой – 3-ей стадий и здоровых доноров.

221,94 нмоль·с<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> ( $\sigma=80,30$ ) тест Манна-Уитни по сравнению с группой больных с 1-ой стадией рака молочной железы  $p=0,32$ . Активность глюкозофосфатизомеразы у больных 3 стадией рака молочной железы ( $n=24$ ) наблюдались близкие значения с таковыми в группе больных с 1-ой стадией и 2-ой стадией РМЖ. Медиана составила 224,31 нмоль·с<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> ( $\sigma=93,46$ ) тест Манна-Уитни по сравнению с группой со 2-ой стадией рака молочной железы  $p=0,71$ . У больных 4-ой стадией рака молочной железы наблюдалось более значительное повышение активности ГФИ до 467,50 нмоль·с<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> ( $\sigma=6,68$ ), тест Манна – Уитни по сравнению с больными с 3-ей стадией рака молочной железы  $p=0,02$ , изменения достоверны. Следует отметить, что наличие злокачественной опухоли определяло значительное повышение активности глюкозофосфатизомеразы, которое оставалось достаточно стабильным в группах больных с 1,2,3-ей стадиями. У больных с 4-ой стадией рака молочной железы наблюдалась максимальная активность глюкозофосфатизомеразы.

Для оценки соотношения метаболической активности различных стадий гликоли-

за выполняли расчеты относительных коэффициентов активностей изученных ферментов, результаты которых представлены в таблице 1.

Исследование соотношений активности ферментов гликолиза показало, что активность фруктозо-1,6-бисфосфатальдолазы значительно превосходит активность глюкозофосфатизомеразы и лактатдегидрогеназы, а активность лактатдегидрогеназы превосходит активность глюкозофосфатизомеразы. Это может вызывать образование избытка триозофосфатов в альдолазной реакции, что, вероятно, вызывает более активный метаболизм глицеральдегид-3-фосфата по неокислительному пентозофосфатному пути.

Соотношение лактатдегидрогеназы и глюкозофосфатизомеразы уменьшается с увеличением стадии заболевания. Это может свидетельствовать о большей экспрессии глюкозофосфатизомеразы в опухолевых клетках, а поскольку во 2-ой, 3-ей стадиях часто диагностируются опухоли с агрессивным фенотипом, то можно сделать предположение о связи агрессивного фенотипа опухолей и степенью экспрессии глюкозофосфатизомеразы.

Таблица 1

**Соотношение активностей ферментов гликолиза в сыворотке крови больных операбельным раком молочной железы**

Соотношение активностей ферментов	1-я стадия	2-я стадия	3-я стадия
Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза / глюкозофосфатизомераза	12,69 (100,00%)*	13,25 (104,41%)	13,46 (106,07%)
Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза / лактатдегидрогеназа	5,09 (100%)	5,68 (111,59%)	6,82 (133,99%)
Лактатдегидрогеназа / глюкозофосфатизомераза	2,49 (100%)	2,33 (93,57%)	1,97 (79,12%)

\* – % соотношение к 1-ой стадии

## Выводы

1. Активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови больных раком молочной железы составила  $485,77 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$  ( $\sigma=193,95$ ), и была на 26,26% выше, чем у здоровых доноров.

2. Активность глюкозофосфатизомеразы у больных раком молочной железы 1-ой стадии была повышена в 1,64 раза по сравнению с аналогичным показателем у доноров и составила  $202,58 \text{ нмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$  ( $\sigma=61,31$ ).

3. Отмечена тенденция к увеличению активности фруктозо-1,6-бисфосфатаальдолазы в сыворотке крови больных операбельным раком молочной железы 1-ой – 3-ей стадии.

4. Уменьшение соотношения активности лактатдегидрогеназы и глюкозофосфатизомеразы при увеличении стадии заболевания может свидетельствовать о большей экспрессии глюкозофосфатизомеразы в опухолевых клетках и, возможно, связано с агрессивным фенотипом опухоли.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Warburg, O. H. Ueber den stoffwechsel der tumoren / O. H. Warburg. – Berlin: Springer, 1926. – 263 p.
2. The metabolism of tumours: 70 years later / G. L. Semenza [et al.] // Novartis Found. Symp. – 2001. – Vol. 240. – P. 251-260.
3. Czernin, J. Positron emission tomography scanning: current and future applications / J. Czernin, M. E. Phelps // Annu. Rev. Med. – 2002. – Vol. 53. – P. 89-112.
4. Biologic correlates of 18fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography / R. Bos [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2002. – Vol. 20. – P. 379-387.
5. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma / M. Kunkel [et al.] // Cancer. – 2003. – Vol. 97. – P. 1015-1024.
6. Крэбтри, Б. Термодинамика и обмен веществ / Б. Крэбтри, Д. Тейлор // Биохимическая термодинамика. – М.: Мир, 1982. – С. 372-427.
7. Howell, B. F. Lactate-to- pyruvate of pyruvate-to-lactate assay for lactate dehydrogenase: a re-examination / B. F. Howell, S. Mc Cune, R. Schaffer // Clin. Chem. – 1979. – Vol. 25, N 2. – P. 269-272.
8. Щеклик, Э. Клиническая ферментология / под ред. Э. Щеклика. – Варшава.: Польское государственное медицинское издательство, 1966. – 491 с.

*Поступила 26.01.2008 г.*